

VERSUCHE ZUR HÄUFIGKEIT DES PLASMIDVERLUSTES
BEI PENICILLINASEBILDENDEN GONOKOKKEN-STÄMMEN
BEI WIEDERHOLTER PASSAGIERUNG IN GEGENWART
VON PENICILLIN UND CEFOTIAM, UND SEINE BEDEUTUNG
FÜR DIE ANTIBIOTIKUMEMPFINDLICHKEIT

ROLAND SCHMELZER

AUS DER DERMATOLOGISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
VORSTAND PROF. DR. OTTO BRAUN-FALCO

VERSUCHE ZUR HÄUFIGKEIT DES PLASMIDVERLUSTES
BEI PENICILLINASEBILDENDEN GONOKOKKEN-STÄMMEN
BEI WIEDERHOLTER PASSAGIERUNG IN GEGENWART
VON PENICILLIN UND CEFOTIAM, UND SEINE BEDEUTUNG
FÜR DIE ANTIBIOTIKUMEMPFINDLICHKEIT

DISSERTATION

ZUM ERWERB DES DOKTORGRADES DER ZAHNHEILKUNDE
AN DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER
LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

VORGELEGT VON
ROLAND SCHMELZER

AUS
TUTZING

JAHR
1986

MIT GENEHMIGUNG DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

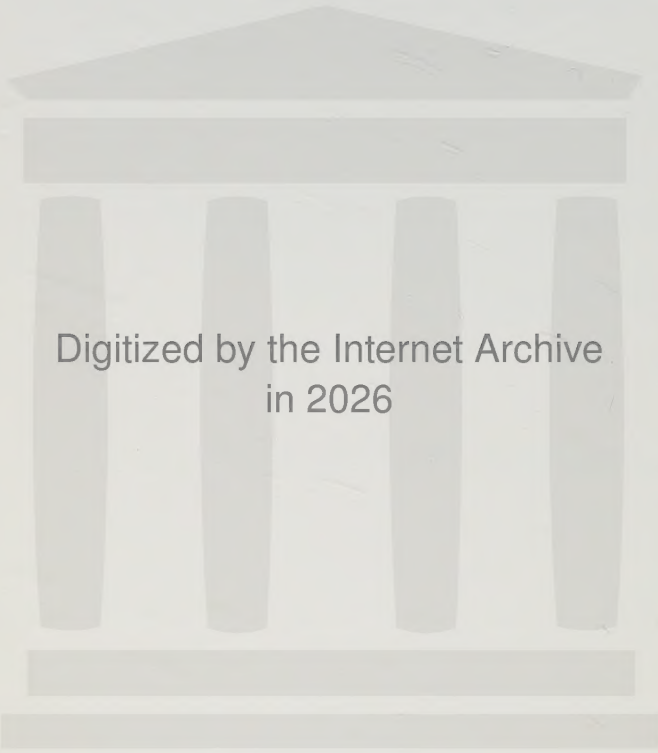
BERICHTERSTATTER: PRIV.-DOZ. DR. H.C. KORTING

MITBERICHTERSTATTER: PROF. DR. O. BRAUN-FALCO

DEKAN: PROF. DR. W. SPANN

TAG DER MÜNDLICHEN PRÜFUNG: 24.03.1987

gewidmet meinen Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

2. MATERIAL

2.1 NEISSERIA GONORRHOEAE-STÄMME DES HAUPTVERSUCHS

2.1.1 NEISSERIA GONORRHOEAE-STÄMME ZU KONTROLLZWECKEN

2.2 VERWENDETE ANTIBIOTIKA IM HAUPTVERSUCH

2.2.1 VERWENDETE ANTIBIOTIKA ZU KONTROLLZWECKEN

3. MEDIEN

3.1 HERSTELLUNG VON SCHOKOLADENAGARPLATTEN

3.2 HERSTELLUNG DER GONOKOKKENBOUILLON

3.3 HERSTELLUNG DER ZUCKERVERGÄRUNGSPLATTEN

4. METHODEN

4.1 VORBEREITUNG DES GONOKOKKENAUSGANGSMATERIALS

4.2 EMPFINDLICHKEITSPRÜFUNG AUF FESTEM MEDIUM VOR BEGINN DES HAUPTVERSUCHS

4.3 KEIMZAHLBESTIMMUNG

4.4 EMPFINDLICHKEITSPRÜFUNG IM FLÜSSIGEN MEDIUM

4.5 FESTLEGUNG DER SUBINHIBITORISCHEN KONZENTRATIONSWERTE FÜR DEN HAUPTVERSUCH

4.6 ERMITTLUNG DER OPTIMALEN FÜLLMENGE

4.7 PRÜFUNG DER REINHEIT DER GONOKOKKEN

4.8 ANTIBIOTIKALÖSUNGEN FÜR DEN HAUPTVERSUCH

4.9 HAUPTVERSUCH

- 4.10 EMPFINDLICHKEITSPRÜFUNG AUF FESTEM MEDIUM NACH
ABSCHLUSS DES VERSUCHS
- 4.11 ABSCHLIESSENDER NITROCEFINTEST AN EINZELKOLONIEN
- 4.12 EMPFINDLICHKEITSPRÜFUNG PLASMIDFREIER GONOKOKKEN
- 4.13 EINFRIEREN DER STÄMME NACH ABSCHLUSS DER VERSUCHE

- 5. ERGEBNISSE
 - 5.1 ERGEBNISSE DER EMPFINDLICHKEITSPRÜFUNG AUF FESTEM
MEDIUM VOR BEGINN DES HAUPTVERSUCHS
 - 5.2 ERGEBNIS DER KEIMZAHLBESTIMMUNG
 - 5.3 ERGEBNISSE DER EMPFINDLICHKEITSPRÜFUNG IM FLÜSSIGEN
MEDIUM
 - 5.4 ERGEBNIS DER ERMITTLUNG DER OPTIMALEN FÜLLMENGE
 - 5.5 ERGEBNIS DER REINHEITSÜBERPRÜFUNG DER GONOKOKKEN
 - 5.6 ERGEBNIS DES HAUPTVERSUCHS
 - 5.7 ERGEBNISSE DER MHK-BESTIMMUNG AUF FESTEM MEDIUM
NACH ABSCHLUSS DES HAUPTVERSUCHS
 - 5.8 ERGEBNIS DES ABSCHLIESSENDEN NITROCEFIN-TESTS AN
EINZELKOLONIEN
 - 5.9 ERGEBNIS DER MHK-BESTIMMUNG PLASMIDFREIER GONOKOKKEN

- 6. DISKUSSION

- 7. ZUSAMMENFASSUNG

- 8. VERZEICHNIS DER TABELLEN

- 9. LITERATURVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

In den fünfziger und sechziger Jahren dieses Jahrhunderts konnte auf der ganzen Welt eine Abnahme der Penicillinempfindlichkeit von *Neisseria gonorrhoeae* festgestellt werden, die sich jedoch in Grenzen hielt. Bis zur Mitte der sechziger Jahre wurden in Mitteleuropa praktisch keine Gonokokken-Stämme aufgefunden, zu deren Abtötung mehr als 2 IE Penicillin/ml Serum nötig waren (Petzold, 1981). Durch Erhöhung der Penicillindosis und durch Verabreichung von Probenecid, das durch Hemmung der tubulären Sekretion der Niere den Blutspiegel zusätzlich erhöht, konnte man für eine gewisse Zeit die abnehmende Penicillinempfindlichkeit ausgleichen. Eine grundsätzliche Änderung der Situation trat im Februar 1976 ein (Ashford and Golash, 1976 und Phillips, 1976), als erstmals in England und in den USA Gonokokken-Stämme isoliert wurden, die sich höchsten Penicillinkonzentrationen gegenüber als resistent erwiesen.

Die Ursache dieser Resistenz liegt in der Fähigkeit des Bakteriums zur Produktion von β -Lactamase, einem Enzym, das den β -Lactamring von Penicillinen und Cephalosporinen zu spalten vermag, und dadurch die Wirksamkeit dieser Antibiotika beeinträchtigt.

Diese β -Lactamasebildung ist nicht chromosomaler Natur, wie die allmähliche Abnahme der Penicillinempfindlichkeit in den fünfziger und sechziger Jahren, sondern sie wird durch Plasmide gesteuert.

Inzwischen haben sich derartige Gonokokken-Stämme immer weiter ausgebreitet. Im Fernen Osten beträgt deren Ausbreitung schon über 50 % (Brown et al., 1983), aber auch in Mitteleuropa nähert sich der Anteil β -Lactamase bildender Stämme bereits der 5 % Marke (Eichmann, 1984), wobei diese in den Niederlanden sogar schon überschritten wurde (Van Embden, 1983). Diese Entwicklung dürfte mit ziemlicher Sicherheit, zumindest ursprünglich im Fernen Osten, wesentlich durch die dort praktizierte Antibiotikugabe negativ beeinflusst worden sein.

In diesem Zusammenhang wird insbesondere immer wieder auf die Praxis der dortigen Prostituierten hingewiesen, Penicillin in nicht zu einer Heilung hinreichenden Dosis oral aufzunehmen.

Diese Tatsache stellt mit Sicherheit für relativ penicillinunempfindliche Gonokokken-Stämme einen Selektionsvorteil dar (Piot, 1978).

Auch scheinen bei manchen Patienten plasmidtragende und nichtplasmidtragende Gonokokken-Stämme gleichzeitig vorzuliegen (Blog et al., 1977). Bei Untersuchungen von Infektketten konnte manchmal nur einer der oben genannten Gonokokken-Stämme nachgewiesen werden. Anscheinend vermag ein eigentlich nur gegenüber nichtplasmidtragenden Stämmen wirksames Antibiotikum wie z. B. Ampicillin in einigen Fällen bei derartigen Mischinfektionen sogar eine Heilung zu bewirken (Blog et al., 1977).

Im Jahre 1978 versuchte man den Ursprung des oben genannten Plasmids zu erforschen.

Primär soll das Plasmid, es konnten zwei verschiedene Arten isoliert werden, das eine mit einem Molekulargewicht von 3,2 M Dalton und das andere mit einem Molekulargewicht von 4,5 M Dalton (Dickgießer, 1983), in vivo von Enterobakterien auf *Haemophilus influenzae* und von diesen auf *Neisseria gonorrhoeae* übertragen worden sein (Sparling et al., 1977).

Aus in vitro Versuchen ist bekannt, daß *Neisseria gonorrhoeae* entsprechende Resistenzplasmide nicht nur aufnehmen können, sondern daß sie sie auch, und zwar in durchaus unterschiedlichem Ausmaß, wieder abgeben können (Roberts and Falkow, 1977). Betrachtet man nun all diese genannten Fakten im Zusammenhang, so muß man im Rahmen der epidemiologischen Risikoabschätzung, sowohl bei der Einführung neuer Antibiotika in die Therapie der Gonorrhoe, als auch bei den bisher bewährten Mitteln stets die Frage ins Auge fassen, inwieweit dadurch in der jeweiligen Population die plasmidtragenden Gonokokken-Stämme beeinflusst werden.

Obwohl man natürlich davon ausgehen muß, daß in vitro Experimente in dieser Hinsicht nur sehr begrenzte Aussagen erlauben, sei im folgenden dennoch der Versuch unternommen, der Antwort auf die oben gestellte Frage ein Stück näher zu kommen.

2. MATERIAL

2.1 NEISSERIA GONORRHOEAE-STÄMME DES HAUPTVERSUCHS

Aus der Stammsammlung der letzten Jahre der Dermatologischen Universitätsklinik München wurden folgende 6 Stämme von *Neisseria gonorrhoeae* zur Durchführung der Versuche herangezogen:

3 prototrophe Stämme vom Auxo-Typ I:	160/83
	5729/83
	1327/83
3 prolinabhängige Stämme vom Auxo-Typ II.	1608/83
	9120/83
	120/83

Die Auxotypisierung der tiefgefrorenen Stämme erfolgte bereits vorher nach der Methode von Carifo und Catlin (Carifo and Catlin, 1973).

Alle oben genannten 6 *Neisseria gonorrhoeae*-Stämme waren gemäß der Aussage des Tests mit den chromogenen Cephalosporinen (O'Callaghan, 1971) β -Lactamasebildner, also plasmidtragend. Alle Stämme trugen wahrscheinlich das Plasmid vom "fernöstlichen Typ", also ein 4,5 M Dalton-Plasmid. Im Gegensatz dazu tragen die afrikanischen Stämme ein 3,2 M Dalton-Plasmid.

2.1.1 NEISSERIA GONORRHOEAE-STÄMME ZU KONTROLLZWECKEN

Nach Abschluß des Hauptversuchs wurde mit den WHO-Referenzstämmen III, V und VII eine abschließende MHK-Bestimmung durchgeführt, um die Korrektheit der erhaltenen Ergebnisse zu überprüfen.

2.2 VERWENDETE ANTIBIOTIKA IM HAUPTVERSUCH

Als Antibiotika wurden für den Versuch Penicillin G und Cefotiam herangezogen. Beim Cefotiam handelt es sich um ein Antibiotikum aus der zweiten Generation der Reihe der Cephalosporine mit einem Arbeitsstandard von 873 mg/g.

Diese Präparate wurden von der Anbieterfirma Grünenthal GmbH, Stolberg, als "working standard" dankenswerterweise zur Verfügung gestellt.

2.2.1 VERWENDETE ANTIBIOTIKA ZU KONTROLLZWECKEN

Die abschließende MHK-Bestimmung wurde zusätzlich mit folgenden Antibiotika durchgeführt:

Cephalotin (Lilly GmbH, Gießen, D) und

Cefazolin (Fujisawa, Osaka, Japan),

beides Cephalosporine der ersten Generation.

3. MEDIEN

3.1 HERSTELLUNG VON SCHOKOLADENAGARPLATTEN

Für die Empfindlichkeitsprüfung auf festem Medium wurde ein Nährboden verwendet, der wie folgt hergestellt wurde:

In einem Glaskolben mit einem Fassungsvermögen von 2500 ml wurden 45 g Proteose Nr. 3 Agar (Difco Detroit, Mich. USA) in 500 ml Aqua dest. gelöst.

In einem zweiten gleichen Glasgefäß wurden 10 g Hämoglobin (Difco, Detroit, Mich. USA) in ebenfalls 500 ml Aqua dest. gelöst. Beide Lösungen wurden mit je einem Tropfen einer Silikon-Antischaumemulsion (Serva, Heidelberg, D) versetzt.

Danach kamen beide Ansätze in den Autoklaven (Aigner, München, D) und wurden 30 Minuten lang bei 120° C autoklaviert. Die noch heißen Glasbehälter kühlten in einem Wasserbad (Mettmert, Schwabach, D) bis auf ca. 56° C ab. Nach diesem Vorgang wurden beide Ansätze gemischt, und unter ständigem Rühren auf einem Magnetrührer führte man der erhaltenen Lösung 20 ml Iso Vitale X Enrichment (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, USA) zu.

Anschließend wurde das Gemisch unter sterilen Bedingungen mit Hilfe eines Petrimaten (Struers, Dänemark) in Petrischalen eingebracht. Die Füllmenge betrug 25 ml. Nach einer Trocknungszeit von ca. 24 Stunden wurden die Nährböden bis zu ihrem Gebrauch in einem Kühlschrank aufbewahrt.

3.2 HERSTELLUNG DER GONOKOKKENBOUILLON

Zur Anzüchtung und Passagierung und ebenfalls für die Empfindlichkeitsprüfung im flüssigen Medium wurde eine Bouillon, modifiziert nach Hafiz und McEntegart (Hafiz and McEntegart, 1976) verwendet, die wie folgt hergestellt wurde:

In einem Glasgefäß mit einem Inhalt von 1000 ml Aqua dest. wurden

15 g Proteose Nr. 3 (Difco, Detroit, Mich. USA)

5 g NaCl

1 g $K_2H_2P_4O_7$

4 g K_2HPO_4

1 g Soluble Starch (Difco, Detroit, Mich. USA)

gelöst.

Nach Versetzung der Lösung mit einem Tropfen einer Silikon-Antischaum-emulsion (Serva, Heidelberg, D), wurde der Glaskolben für 30' bei 120° C autoklaviert (Autoklav, Aigner, München, D). Nach dem Abkühlen in einem Wasserbad (Memmert, Schwabach, D) auf ca. 56° C brachte man eine Lösung aus 10 ml Iso Vitale X Enrichment (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, USA), 4 g Glucose und 42 mg Bicarbonat in die Bouillon ein. Dies geschah unter sterilen Bedingungen mit Hilfe einer 20 ml Einmalspritze und einem darauf aufgesetzten Sterilfilter (Sartorius GmbH, Göttingen, D).

Nach Fertigstellung der Nähr-Bouillon wurde deren pH zwischen 7,2 und 7,4 mit N/NaOH eingestellt, da nur in diesem pH-Bereich ein optimales Wachstum möglich ist.

Die Gonokokken-Nährbouillon wurde täglich frisch hergestellt.

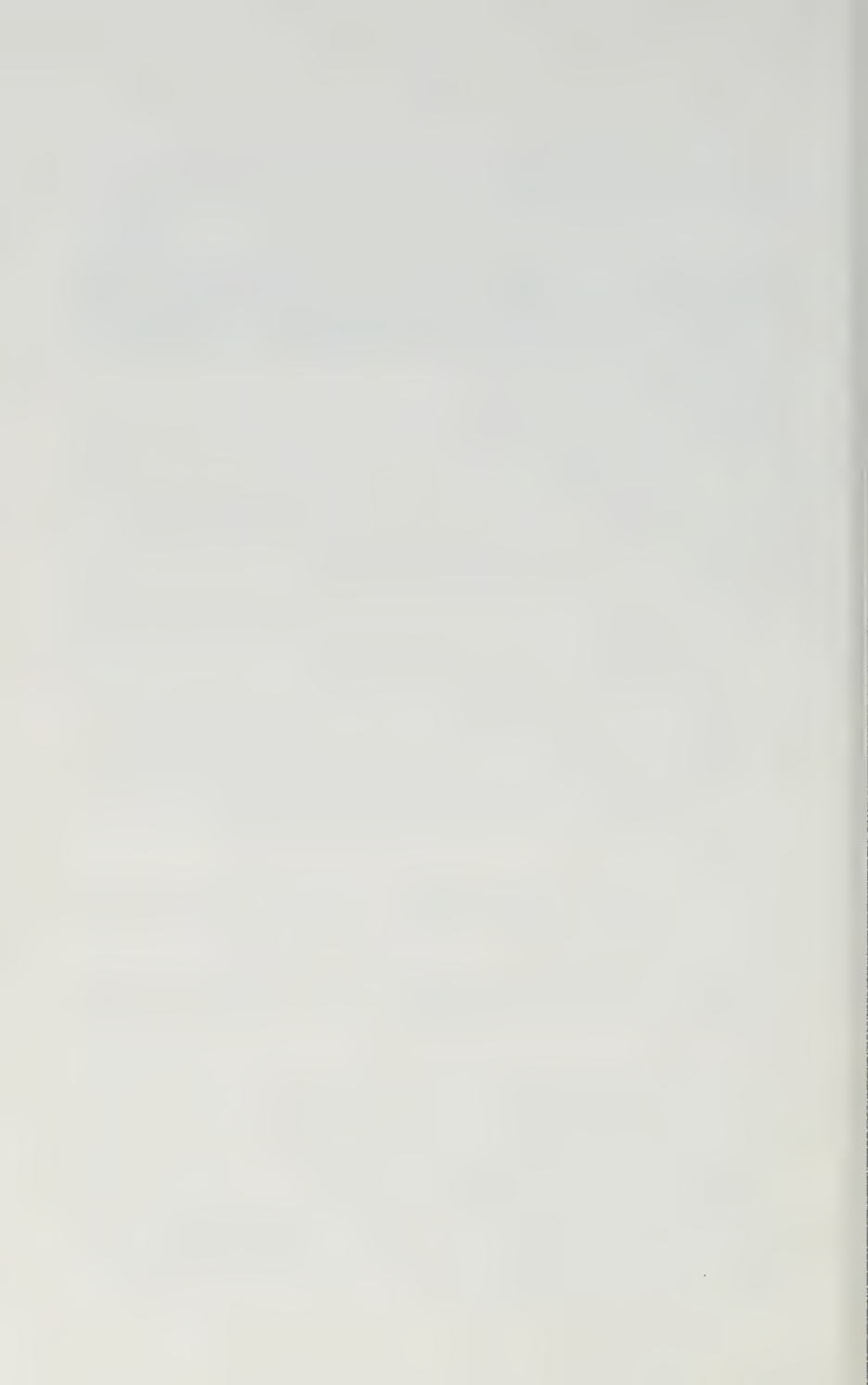
3.3 HERSTELLUNG DER ZUCKERVERGÄRUNGSPLATTEN

Die Zuckervergärung der plasmidtragenden *Neisseria gonorrhoeae*-Stämme wurde auf speziellen Platten getestet, die wie folgt hergestellt wurden:

Man gab in einen Glaskolben mit 1000 ml Aqua dest. 41 g Columbia Agar (BAG, Lich, D) und ließ ihn aufquellen. Nach Zugabe von einem Tropfen einer Silikon-Antischaumemulsion (Serva, Heidelberg, D) kam der Ansatz für 30' bei 120° C in den Autoklaven (Aigner, München, D). Danach erfolgte eine Abkühlung auf ca. 56° C im Wasserbad (Memmert, Schwabach, D). Anschließend wurde der Lösung 10 ml Phenolrot und 20 ml PPLO Serum-Fraktion (Difco, Detroit, Mich. USA) zugesetzt. Das Phenolrot lag in

einer 0,5 %igen Lösung vor.

Anschließend wurde der Ansatz unter sterilen Bedingungen mit einem Dosiergerät (Petrinat, Struers, Dänemark) in Petrischalen eingefüllt. Die Füllmenge betrug 25 ml. Nach einer Trocknungszeit von 24 Stunden wurden die Zuckervergärungsplatten bis zu ihrem Gebrauch in einem Kühlschrank gelagert.



4. METHODEN

4.1 VORBEREITUNG DES GONOKOKKENAUSGANGSMATERIALS

Initial wurden die in 2.1 genannten, bei -80°C tiefgefrorenen 6 Gonokokkenstämme bei Zimmertemperatur aufgetaut. Als Einfriermedium benutzte man fötales Kälberserum (Gibco, Chagrin Falls, Ohio, USA) mit 10 % Saccharose (Merck, Darmstadt, D). Nach Aufbringung der verschiedenen Gonokokkensuspensionen auf Schokoladenagarplatten, wurden sie mittels eines sterilen Glasspatels ausgestrichen. Nach 24stündiger Bebrütung bei 37°C und in einem 5 %igen CO_2 -Milieu im Brutschrank (Heraeus, Hanau, D) wurden von allen 6 Stämmen Einzelkolonien ausgestrichen. Nach einer erneuten Bebrütung von 24 Std. konnte man die gewonnenen Einzelkolonien subkultivieren, und nach einem weiteren Tag im Brutschrank lag genügend Gonokokkenausgangsmaterial für die nachfolgenden Versuche vor.

4.2 EMPFINDLICHKEITSPRÜFUNG AUF FESTEM MEDIUM VOR BEGINN DES HAUPTVERSUCHES

Der Einstiegsversuch stellte eine Empfindlichkeitsprüfung der in 2.1 beschriebenen *Neisseria gonorrhoeae*-Stämme gegenüber den Antibiotika Penicillin G und Cefotiam mittels des Agar-Dilutionstests (Korting, 1984) dar. Man führte also eine minimale Hemmkonzentrations(MHK)-Bestimmung auf Schokoladenagarplatten durch.

Sowohl für Penicillin als auch für Cefotiam mußten zuerst Verdünnungsreihen hergestellt werden.

Nach Beschriftung der Reagenzgläser mit den verschiedenen Konzentrationen, wurden in die Gläser, die dann die höchsten Konzentrationen enthalten sollten, 2 ml Aqua dest. mit einer Pipette (Eppendorf, Hamburg, D) eingebracht. In alle weiteren Reagenzgläser wurde je 1 ml eingefüllt. In dem Glas, in dem sich die 2 ml Aqua dest. befanden, wurde nun die notwendige Menge des Antibiotikumpulvers, nämlich 0,41 g/2 ml

für Penicillin G und analog dazu in einer eigenen Reihe 25,6 mg/2ml für Cefotiam, aufgelöst.

Nach guter Durchmischung auf einem Excenterrüttler (Cenco, Breda, Niederlande) wurde mittels einer Pipette aus diesem Glas 1 ml in Glas 2 gefüllt. Im Glas 2 befanden sich also jetzt 1 ml Aqua dest. und 1 ml Antibiotikumlösung. Nach gutem Durchrütteln pipettierte man nun davon wieder 1 ml in Reagenzglas Nr. 3, danach aus Glas Nr. 3 1 ml in Glas Nr. 4 usw. Dieser Vorgang wiederholte sich nun so oft, bis man alle Konzentrationsstufen erfaßt hatte. Aus dem letzten Glas mußte 1 ml verworfen werden, um in allen Gläsern jeweils 1 ml Antibiotikumlösung zu haben. Die verschiedenen Konzentrationsstufen betrugen beim Penicillin 16 µg/ml, 32 µg/ml, 64 µg/ml, 128 µg/ml, 256 µg/ml, 512 µg/ml, 1024 µg/ml und 2048 µg/ml; beim Cefotiam 0,031 µg/ml, 0,062 µg/ml, 0,125 µg/ml, 0,25 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 4 µg/ml, 8 µg/ml, 16 µg/ml, 32 µg/ml und 64 µg/ml.

Nach Fertigstellung dieser Verdünnungsreihen wurde nun wie in 3.1 beschrieben, eine Schokoladenagarlösung hergestellt, von der jeweils 100 ml in 20 Erlenmeyerkolben gefüllt wurden. Jede einzelne der obigen Konzentrationen wurde in einen eigenen Erlenmeyerkolben geschüttet und gut durchmischt. Danach wurden die Lösungen der verschiedenen Glaskolben auf jeweils 4 Petrischalen verteilt. Zu Kontrollzwecken führte man die MHK-Bestimmung auf 4 Platten parallel durch.

Nach Verfestigung und Trocknung der antibiotikumhaltigen Agarböden mit den verschiedenen Konzentrationsstufen wurden nun alle 6 Gonokokkenstämme maschinell überimpft.

Die Gonokokken wurden von den in 4.1 beschriebenen Subkulturagarplatten mittels einer Öse in eine Traubenzuckerlösung eingerieben (Standard I - Nährbouillon, Merck, Darmstadt, D). Nach Erhalt einer homogenen Suspension durch Rütteln (Excenterrüttler, Cenco, Breda, Niederlande), pipettierte man (Kolbenhubpipette, Eppendorf, Hamburg, D) jeden Stamm für sich in die Impfvorrichtung des Multipoint Inoculator (Mast, Diagnostica, Hamburg, D), der dann die Antibiotikaböden beimpfte. Die

überimpften Nährböden stellte man für 24 Stunden bei 37° C und 5 %igen CO₂-Milieu in den Brutschrank (Heraeus, Hanau, D).

Am nächsten Tag konnten die Ergebnisse abgelesen werden und die minimale Hemmkonzentration bestimmt werden.

4.3 KEIMZAHLBESTIMMUNG

Vor dem Bouillonverdünnungstest mußte anhand einer Keimzahlbestimmung ermittelt werden, wieviele Keime in einer Gonokokkensuspension von 0,15 optischer Dichte bei 500 nm Wellenlänge vorhanden sind. Es wurde in Reagenzgläsern eine Verdünnungsreihe hergestellt, ausgehend von Glas 1, in dem sich eine Lösung aus Bouillon (siehe 3.2) und Gonokokken befand, die im Photometer (Spectronic 20, Bausch und Lomb, Chicago, USA) auf eine optische Dichte von 0,15 bei 500 nm Wellenlänge eingestellt wurde. Aus diesem Glas brachte man 0,1 ml Gonokokkensuspension in Glas 2 ein, in dem sich 0,9 ml frische Bouillon befanden. Dieser erste Schritt bedeutete eine Verdünnung von 1:10. Folgend wurden aus Glas 2 wiederum 0,1 ml Gonokokkensuspension in Glas 3 mit ebenfalls 0,9 ml frischer Bouillon gegeben, usw. Diese Reihe wurde bis zu einer Verdünnung von 10⁻⁹ fortgesetzt.

Mittels einer Pipette (Eppendorf, Hamburg, D) tropfte man aus jedem Reagenzglas dieser Versuchsreihe 0,1 ml Gonokokkensuspension auf Schockadenagarböden. Nach dem Ausspateln kamen die Nährböden für 24 Stunden bei 37° C und 5 %igem CO₂-Milieu in den Brutschrank (Heraeus, Hanau, D) und konnten am nächsten Tag ausgewertet werden.

4.4 EMPFINDLICHKEITSPRÜFUNG IM FLÜSSIGEN MEDIUM

Analog zum Versuch auf festem Medium mußte nun auch eine MHK-Bestimmung in der Bouillon (siehe 3.2) durchgeführt werden.

Initial wurden für Penicillin G und für Cefotiam die gleichen Verdünnungsreihen hergestellt, wie in 4.2 beschrieben. Vom Bakterienausgangsmaterial (siehe 4.1), das täglich neu subkultiviert wurde, wurde von jedem der 6 Stämme mit einer Platinöse eine nicht definierte Menge von Gonokokken in einen eigenen Erlenmeyerkolben, der mit 100 ml Bouillon gefüllt war, eingerieben. Diese Kolben verschloß man und stellte sie zur Bebrütung für 24 Stunden bei 37° C in ein Warmwasserrüttelbad (Köttermann, Hänigsen, D). Zu Beginn des Bouillonverdünnungstests mußte durch Auffüllung der obigen bebrüteten Testansätze mit frischer Bouillon eine Gonokokkensuspension mit einer definierten optischen Dichte hergestellt werden.

Für jede Konzentrationsstufe der Verdünnungsreihe (siehe 4.2) wurde ein Reagenzglas mit Gonokokkensuspension im Photometer (Spectronic 20 Bausch and Lomb, Chicago, USA) durch Zugabe von frischer Bouillon auf eine optische Dichte von 0,15 bei 500 nm Wellenlänge eingestellt. Die Füllmenge der Reagenzgläser betrug 4,7 ml, die mit 0,3 ml der jeweiligen Antibiotikumkonzentration auf 5 ml aufgefüllt wurde.

Sämtliche Reagenzgläser wurden fest mit Wattestopfen, die mit Alufolien umwickelt waren, verschlossen, um einem Keimbefall entgegenzutreten. Nach Fertigstellung der Bouillonverdünnungsansätze wurden alle Gläser im Warmwasserrüttelbad (Kottermann, Hänigsen, D) bei 37° C und mittlerer Rüttelgeschwindigkeit für 24 Stunden bebrütet. Am darauffolgenden Tag konnte im Photometer die MHK-Bestimmung durchgeführt werden.

4.5 FESTLEGUNG DER SUBINHIBITORISCHEN KONZENTRATIONSWERTE FÜR DEN HAUPTVERSUCH

Nach Erhalt der MHK-Werte auf festem und im flüssigen Medium, konnte man nun die subinhibitorischen Konzentrationswerte für den Hauptversuch festlegen. Man wählte für Cefotiam die höchste subinhibitorische Konzentration, nämlich 0,125 µg/ml und die fünftöchste also 0,008 µg/ml.

Im Zusammenhang mit Penicillin wurden abweichend davon die Konzentrationsstufen 0,5 und 0,031 µg/ml berücksichtigt.

4.6 ERMITTLUNG DER OPTIMALEN FÜLLMENGE

Um das optimale Wachstum der Gonokokken in der Bouillon zu gewährleisten, sie sollten im Hauptversuch im Warmwasserrüttelbad 24 Std. bebrütet werden, mußte noch die geeignete Füllmenge der Reagenzgläser (130 x 14 mm) ermittelt werden. 10 Gläser, mit den Füllmengen von 1 ml bis zu 10 ml der Gonokokkenbouillon, wurden über Nacht bebrütet. Am nächsten Morgen konnte im Photometer (Spectronic 20, Bausch and Lomb, Chicago, USA) der Versuch ausgewertet werden.

4.7 PRÜFUNG DER REINHEIT DER GONOKOKKEN-STÄMME

Um vor Beginn des Hauptversuches noch einmal die Reinheit der 6 Gonokokken-Stämme zu überprüfen, wurden folgende Tests durchgeführt:

Auf Zuckervergärungsplatten wurde flächenhaft Gonokokkenmaterial mit einer Öse ausgestrichen. Darauf legte man nun industriell vorgefertigte Zuckerplättchen (Bio Merieux, Charbonnieres-les-Bains, Frankreich), in unserem Fall Maltose-, Dextrose- und Saccharoseplättchen. Nach einer 24stündigen Bebrütungsphase im Brutschrank (Heraeus, Hanau, D) konnte das Ergebnis abgelesen werden. Der zweite Test beruhte auf einer Farb-reaktion mit chromogenem Cephalosporin, inkorporiert in Papierscheibchen (Cefinase, BBL, Microbiology System, Cockeyville, USA). Auf diese, mit einem Tropfen Aqua dest. befeuchteten Plättchen, wurde mit einer Öse etwas Gonokokkenmaterial aufgebracht. Plasmidtragende Gonokokken werden in diesem Versuch durch spontane Rotfärbung angezeigt.

Drittens sollte der Oxydase-Test durchgeführt werden. Die Patho-Tec-CO-Teststreifen (Gödecke, Freiburg, D) dienen dem Nachweis des Enzyms Cytochromoxydase bei Gonokokken. Bei Berührung der Stäbchen mit Gonokokkenmaterial sollte eine Blaufärbung eintreten.

Abschließend wurden von allen Präparaten noch Färbepreparate hergestellt, um unter dem Mikroskop die einheitliche Gram-Färbung und die Struktur der Gonokokken zu überprüfen, und damit jede Verunreinigung auszuschließen.

4.8 ANTIBIOTIKALÖSUNGEN FÜR DEN HAUPTVERSUCH

Die festgelegten Konzentrationen (siehe 4.5) wurden auf Vorrat hergestellt. Sie wurden portionsweise in Eppendorf-Reaktionsgefäße gefüllt, pro Konzentration ca. 40 Stück, und bei -80°C eingefroren.

4.9 HAUPTVERSUCH

Im Hauptversuch sollte nun getestet werden, nach wievielen Passagierungen im flüssigen Medium die 6 *Neisseria gonorrhoeae*-Stämme, die täglich den verschiedenen Antibiotikumkonzentrationen (siehe 4.5) ausgesetzt wurden, ihr Plasmid und damit die Fähigkeit zur β -Lactamase-Bildung verlieren, und falls tatsächlich ein Plasmidverlust eintreten sollte, inwieweit dieser die Empfindlichkeit der Bakterien beeinflußt.

Durch Einreiben von Bakterienmaterial in Bouillon (siehe 3.2) wurde von allen zu testenden Stämmen (siehe 2.1) eine Suspension hergestellt, die im Photometer (Spectronic 20, Bausch and Lomb, Chicago, USA) einer optischen Dichte von 0,15 bei 500 nm Wellenlänge entspricht. Aus jeder der erhaltenen 6 Suspensionen wurden jeweils 5 ml in 4 Reagenzgläser überpipettiert (Kolbenhubpipette, Eppendorf, Hamburg, D), man erhielt also insgesamt 24 Gläser. Anders ausgedrückt heißt das, daß es von jedem Stamm ein Glas A, B, C und D gab. In die Reagenzgläser A und B pipettierte man anschließend die Lösungen von zwei unterschiedlichen subinhibitorischen Antibiotikumkonzentrationen von Penicillin G (siehe 4.5), in A die höhere und in B die niedrigere. Die Gläser C und D erhielten die entsprechende Menge von Cefotiam (siehe 4.5). Nach diesem Vorgang mischte man den Inhalt der Reagenzgläser auf einem Rüttler

(Cenco, Breda, Niederlande) gut durch, flammte die Ränder ab, und verschloß die Gläser fest mit Wattestopfen, die mit Alufolie umwickelt waren.

In einem Ständer stehend wurden die 24 Gefäße ins Warmwasserrüttelbad (Kottermann, Hänigsen, D) gestellt und bei 37° C und unter mittlerer Rüttelgeschwindigkeit 24 Stunden bebrütet.

Am darauffolgenden Tag wurde das Wachstum der Gonokokkenstämme überprüft. Durch die Messung im Photometer zeigte sich, daß die optische Dichte von 0,15 in allen Gläsern auf 0,6 bis 0,7 angestiegen war.

Aus jedem Reagenzglas wurde nun eine Menge von 0,1 ml auf Schokoladenagarplatten pipettiert und ausgespatelt. Diese Nährböden sollten anschließend 24 Stunden bebrütet und danach dem Nitrocefintest (siehe 4.7) zugeführt werden. Für die zweite Passagierung verdünnte man nun die Gonokokkensuspensionen vom Vortag, die eine optische Dichte von 0,6 bis 0,7 aufwiesen, durch Zugabe von frischer Bouillon, mittels eines Dosiergerätes, wieder auf eine optische Dichte von 0,15 herunter. Aus den 24 im Photometer neu eingestellten Suspensionen wurden nun wiederum jeweils 5 ml in frische Gläser pipettiert, denen dann ebenfalls wieder die Lösungen unterschiedlicher subinhibitorischer Antibiotikumkanzenzentrationen zugeführt wurden. Im Anschluß an eine gute Durchmischung erfolgte wieder die Bebrütung im Warmwasserrüttelbad.

Auf diese Weise wurden 30 solcher Passagierungen in Folge durchgeführt. Wie oben erwähnt, beimpfte man natürlich auch täglich Agarplatten mit den jeweils erhaltenen Gonokokkensuspensionen, um sie nach der Bebrütung dem Nitrocefin-Test zuzuführen. Zugleich konnte man anhand dieser Platten eventuelle Verunreinigungen leicht erfassen, und falls nötig, reines Gonokokkenmaterial von den Agarplatten vom Vortage wieder neu in die Bouillon einreiben.

4.10 EMPFINDLICHKEITSPRÜFUNG AUF FESTEM MEDIUM NACH ABSCHLUSS DES VERSUCHES

Wie bereits erwähnt, schloß man den Hauptversuch nach 30tägiger Subkultivierung ab. Die bei der letzten Passage erhaltenen Bakteriensuspensionen wurden erneut dem Agardilutionstest zugeführt, der nach den gleichen Regeln ablief wie in 4.2 beschrieben. Nur wurden zusätzlich zu Kontrollzwecken zwei weitere Antibiotika, nämlich Cephalotin und Cefazolin durchgetestet (siehe 2.2.1), und den 6 Stämmen des Hauptversuchs (siehe 2.1) wurden die WHO-Referenzstämme III, V und VII (siehe 2.1.1) zur Seite gestellt.

4.11 ABSCHLIESSENDER NITROCEFİN-TEST AN EINZELKOLONIEN

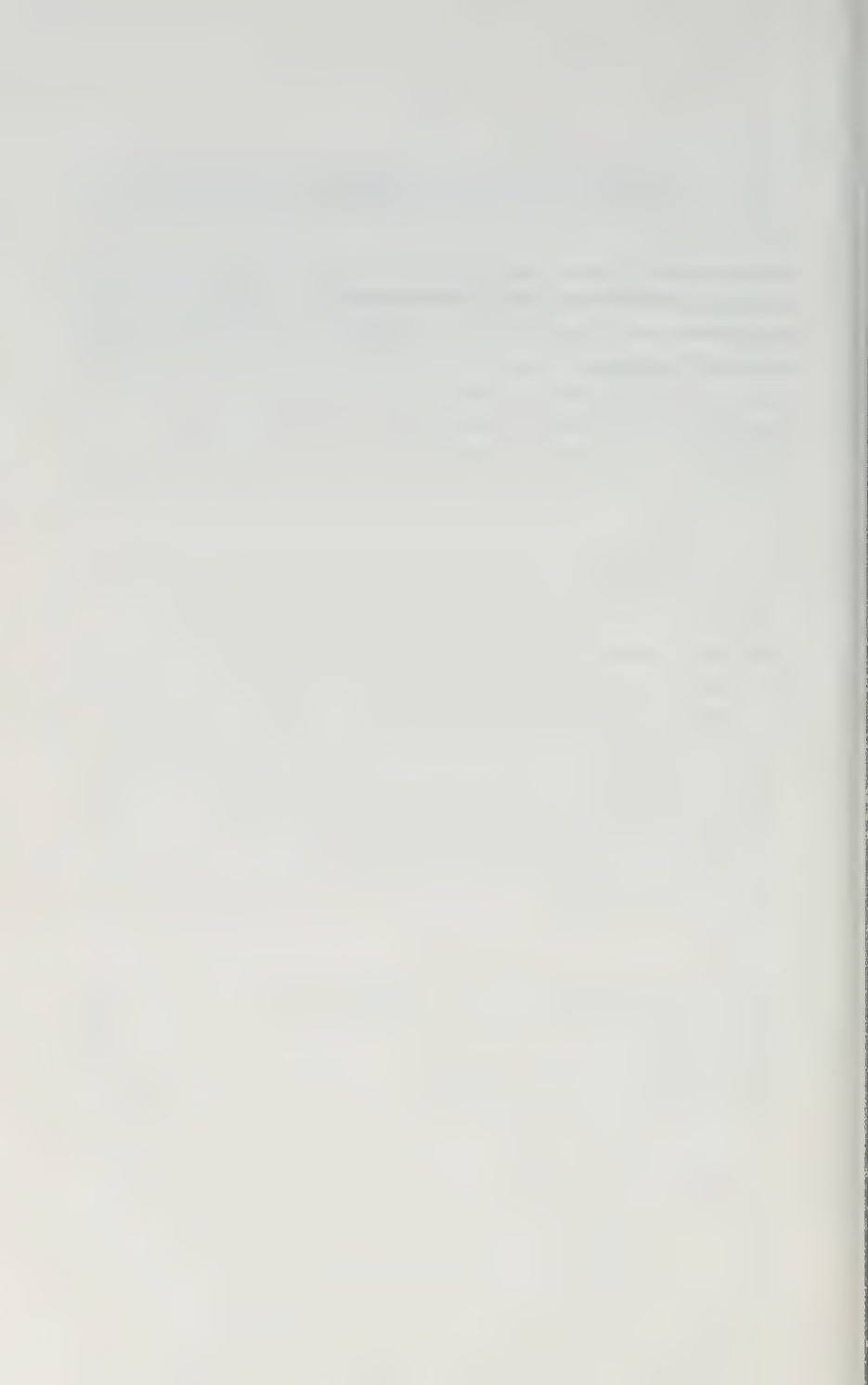
Aus den bei der letzten Passagierung gewonnenen Gonokokkensuspensionen wurden je 0,1 ml auf Agarplatten pipettiert und ausgespatelt. Nach 24-stündiger Bebrütung wurden Einzelkolonien ausgestrichen und erneut bebrütet. Von den am nächsten Tag erhaltenen Einzelkolonien wurden pro Stamm und Antibiotikumkonzentration jeweils 100, also insgesamt 2400, verschieden imponierende ausgewählt, und erneut auf Agarplatten ausgestrichen. Nach einer Verweildauer von 24 Stunden im Brutschrank (Heraeus, Hanau, D) wurden sie dem Test mit den chromogenen Cephalosporinen (siehe 4.7) zugeführt.

4.12 EMPFINDLICHKEITSPRÜFUNG PLASMIDFREIER GONOKOKKEN

Die Einzelkolonien, die sich als plasmidfrei erweisen sollten, wurden erneut dem Agardilutionstest (Korting 1984) zugeführt. (Versuchsablauf analog 4.10)

4.13 EINFRIEREN DER STÄMME NACH ABSCHLUSS DER VERSUCHE

Nach Abschluß aller Versuche wurden die dann vorliegenden Gonokokkenstämme in ein Einfriermedium (fötales Kälberserum, Gibco, Chagrin Falls Ohio, USA und 10 % Saccharose, Merck, Darmstadt, D) eingebracht und in Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei -80°C eingefroren.



5. ERGEBNISSE

5.1 ERGEBNISSE DER EMPFINDLICHKEITSPRÜFUNG AUF FESTEM MEDIUM VOR BEGINN DES HAUPTVERSUCHS (SIEHE 4.2)

Nachdem die überimpften Nährböden 24 Stunden bebrütet waren, las man die Ergebnisse ab. Konnte mit dem bloßen Auge bei einer bestimmten Konzentration kein Wachstum der Gonokokken mehr festgestellt werden, so war die minimale Hemmkonzentration erreicht.

Es ergaben sich folgende Werte (Korting und Abeck, 1984):

Tabelle 1: MHK-Werte für Penicillin auf festem Medium vor Beginn des Hauptversuchs

Auxo-Typ	Stamm	MHK µg/ml
I	160/83	256
I	5729/83	512
I	1327/83	512
II	1608/83	512
II	9120/83	512
II	120/83	256

Das geometrische Mittel der MHK von allen Stämmen lag bei:

$$\bar{g} = 406 \text{ µg/ml}$$

Aufgeschlüsselt nach Auxo-Typen ergaben sich folgende geometrische Mittel:

Auxo-Typen I: $\bar{g} = 406 \text{ µg/ml}$

Auxo-Typen II: $\bar{g} = 406 \text{ µg/ml}$

Tabelle 2: MHK-Werte für Cefotiam auf festem Medium vor Beginn des Hauptversuchs

Auxo-Typ	Stamm	MHK µg/ml
I	160/83	0,5
I	5729/83	0,5
I	1327/83	0,25
II	1608/83	0,25
II	9120/83	0,25
II	120/83	0,25

Das geometrische Mittel der MHK von allen Stämmen lag bei:

$$\bar{g} = 0,315 \text{ µg/ml}$$

Aufgeschlüsselt nach Auxo-Typen ergaben sich folgende geometrische Mittel:

Auxo-Typen I: $\bar{g} = 0,396 \text{ µg/ml}$

Auxo-Typen II: $\bar{g} = 0,25 \text{ µg/ml}$

5.2 ERGEBNIS DER KEIMZAHLBESTIMMUNG (SIEHE 4.3)

Nach Auszählung der geeigneten Platten ergab sich bei einer optischen Dichte von 0,15 bei 500 nm Wellenlänge folgender Wert:

$$1,2 \times 10^4 \text{ Keime / µl bzw. } 1,2 \times 10^7 \text{ Keime / ml.}$$

5.3 ERGEBNISSE DER EMPFINDLICHKEITSPRÜFUNG IM FLÜSSIGEN MEDIUM (SIEHE 4.4)

Nach 24stündiger Bebrütung wurde mittels Photometer die MHK-Bestimmung durchgeführt.

Stieg die eingestellte optische Dichte auf Werte über 0,15 an, so war ein Wachstum erfolgt. Blieb die optische Dichte von 0,15 bei bestimmten Konzentrationen konstant, so war kein Wachstum mehr eingetreten und damit die minimale Hemmkonzentration erreicht.

Es ergaben sich folgende Werte:

Tabelle 3: MHK-Werte für Penicillin in flüssigem Medium vor Beginn des Hauptversuchs

Auxo-Typ	Stamm	MHK $\mu\text{g/ml}$
I	160/83	512
I	5729/83	512
I	1327/83	512
II	1608/83	512
II	9120/83	512
II	120/83	512

Das geometrische Mittel der MHK von allen Stämmen lag bei:

$$\bar{g} = 512 \mu\text{g/ml}$$

Aufgeschlüsselt nach Auxo-Typen ergaben sich folgende geometrische Mittel:

Auxo-Typen I: $\bar{g} = 512 \mu\text{g/ml}$

Auxo-Typen II: $\bar{g} = 512 \mu\text{g/ml}$

Tabelle 4: MHK-Werte für Cefotiam in flüssigem Medium vor Beginn des Hauptversuchs

Auxo-Typ	Stamm	MHK µg/ml
I	160/83	0,25
I	5729/83	0,25
I	1327/83	0,25
II	1608/83	0,25
II	9120/83	0,25
II	120/83	0,25

Das geometrische Mittel der MHK von allen Stämmen lag bei:

$$\bar{g} = 0,25 \text{ µg/ml}$$

Aufgeschlüsselt nach Auxo-Typen ergaben sich folgende geometrische Mittel:

Auxo-Typen I: $\bar{g} = 0,25 \text{ µg/ml}$

Auxo-Typen II: $\bar{g} = 0,25 \text{ µg/ml}$

5.4 ERGEBNIS DER ERMITTLUNG DER OPTIMALEN FÜLLMENGE

Der unter 4.6 beschriebene Versuch erbrachte das Ergebnis, daß bei 5 ml das beste Wachstum eingetreten war. Bei dieser ermittelten Menge wurde dann schließlich auch der Hauptversuch durchgeführt.

5.5 ERGEBNIS DER REINHEITSÜBERPRÜFUNG DER GONOKOKKEN

Die vier angewandten Tests (siehe 4.7) zeigten folgende Ergebnisse:

Der Zuckervergärungstest brachte das für die verwendeten Gonokokkenstämme (2.1) typische Ergebnis. Nur um die Dextroseplättchen auf den Zuckerplatten bildete sich ein heller Hof.

Beim Nitrocefintest trat bei allen Stämmen eine spontane Rotfärbung ein, was bewies, daß alle noch plasmidtragend waren.

Auch der Oxydasetest zeigte ein positives Ergebnis. Alle Teststreifen färbten sich blau und wiesen damit das Enzym Cytochromoxydase nach.

Die abschließende Gram-Färbung zeigte unter dem Mikroskop das typische Bild gram-negativer Diplokokken, ohne jegliche Verunreinigung.

Alle 6 Stämme lagen also noch in ihrer ursprünglichen Form vor und konnten so das Ausgangsmaterial für den Hauptversuch sein.

5.6 ERGEBNIS DES HAUPTVERSUCHS (4.9)

Der Hauptversuch sollte zeigen, nach wievielen Passagierungen unter Einwirkung von verschiedenen subinhibitorischen Antibiotikumkanzentrationen die β -Lactamase bildenden Gonokokkenstämme ihr Plasmid verlieren.

Der tägliche Nitrocefintest erbrachte immer das gleiche Ergebnis, also auch nach der 30. Passagierung, nämlich die sofortige Rotfärbung der Plättchen und damit den Nachweis, daß ein gleichzeitiger Plasmidverlust bei allen Bakterien nicht stattfand. Einzelne Plasmidabgaben konnten mit diesem Verfahren nicht ermittelt werden.

5.7 ERGEBNISSE DER MHK-BESTIMMUNG AUF FESTEM MEDIUM NACH ABSCHLUSS DES HAUPTVERSUCHES (SIEHE 4.10)

Die bei der letzten Passagierung erhaltenen Bakteriensuspensionen sollten erneut dem Agardilutionstest zugeführt werden; es ergaben sich folgende Werte:

Tabelle 5: MHK-Werte für Penicillin auf festem Medium nach Abschluß des Hauptversuchs

Auxo-Typ	Stamm	MHK µg/ml
I	160/83	256
I	5729/83	256
I	1327/83	512
II	1608/83	512
II	9120/83	512
II	120/83	256
	Ref. III	0,0125
	Ref. V	0,5
	Ref. VII	0,064

Das geometrische Mittel der MHK von allen Stämmen (außer den Ref.-Stämmen) lag bei:

$$\bar{g} = 362 \text{ µg/ml}$$

Aufgeschlüsselt nach Auxo-Typen ergaben sich folgende geometrische Mittel:

Auxo-Typen I: $\bar{g} = 322 \text{ µg/ml}$

Auxo-Typen II: $\bar{g} = 406 \text{ µg/ml}$

Tabelle 6: MHK-Werte für Cefotiam auf festem Medium nach Abschluß des Hauptversuchs

Auxo-Typ	Stamm	MHK µg/ml
I	160/83	0,5
I	5729/83	0,5
I	1327/83	0,25
II	1608/83	0,5
II	9120/83	0,25
II	120/83	0,25
	Ref. III	0,032
	Ref. V	0,125
	Ref. VII	0,064

Das geometrische Mittel der MHK von allen Stämmen (außer den Ref.-Stämmen) lag bei:

$$\bar{g} = 0,353 \text{ µg/ml}$$

Aufgeschlüsselt nach Auxo-Typen ergaben sich folgende geometrische Mittel:

Auxo-Typen I: $\bar{g} = 0,396 \text{ µg/ml}$

Auxo-Typen II: $\bar{g} = 0,315 \text{ µg/ml}$

Tabelle 7: MHK-Werte für Cephalotin

Auxo-Typ	Stamm	MHK $\mu\text{g/ml}$
I	160/83	16
I	5729/83	16
I	1327/83	8
II	1608/83	16
II	9120/83	16
II	120/83	16
	Ref. III	0,5
	Ref. V	2
	Ref. VII	1

Das geometrische Mittel der MHK von allen Stämmen (außer den Ref.-Stämmen) lag bei:

$$\bar{g} = 14 \mu\text{g/ml}$$

Aufgeschlüsselt nach Auxo-Typen ergaben sich folgende geometrische Mittel:

Auxo-Typen I: $\bar{g} = 12 \mu\text{g/ml}$

Auxo-Typen II: $\bar{g} = 16 \mu\text{g/ml}$

Tabelle 8: MHK-Werte für Cefazolin

Auxo-Typ	Stamm	MHK $\mu\text{g/ml}$
I	160/83	8
I	5729/83	8
I	1327/83	4
II	1608/83	8
II	9120/83	8
II	120/83	8
	Ref. III	0,5
	Ref. V	2
	Ref. VII	1

Das geometrische Mittel der MHK von allen Stämmen (außer der Ref.-Stämme) lag bei:

$$\bar{g} = 7,127 \mu\text{g/ml}$$

Aufgeschlüsselt nach Auxo-Typen ergaben sich folgende geometrische Mittel:

Auxo-Typen I: $\bar{g} = 6,35 \mu\text{g/ml}$

Auxo-Typen II: $\bar{g} = 8,0 \mu\text{g/ml}$

5.8 ERGEBNIS DES ABSCHLIESSENDEN NITROCEFİN-TESTS AN EINZELKOLONIEN

Aus den 2400 Einzelkolonien, die dem Nitrocefīn-Test zugeführt wurden, konnte nur eine einzige ermittelt werden, und zwar vom Stamm 9120/83, die das Plasmid verloren hatte. Es geschah unter Einwirkung der höheren Cefotiamkonzentration.

5.9 ERGEBNIS DER MHK-BESTIMMUNG PLASMIDFREIER GONOKOKKEN (SIEHE 4.12)

Für die plasmidfreie Einzelkolonie vom Stamm 9120/83 (Auxo-Typ II) ergaben sich folgende MHK-Werte:

Tabelle 9: MHK-Wert des plasmidfreien Stammes

Antibiotikum	MHK $\mu\text{g/ml}$
Penicillin G	4
Cefotiam	0,5
Cephalotin	8
Cefazolin	4

6. DISKUSSION

Die Tatsache, daß nach 30 Passagierungen im flüssigen Medium unter Selektionsdruck, ausgeübt von Penicillin und Cefotiam, nur eine einzige Einzelkolonie isoliert werden konnte, die ihr Plasmid abgab, deutet auf eine hohe Stabilität hin. In verschiedenen Literaturstellen wird dieses Ergebnis bestätigt, z. B. führte Percival einen ähnlichen Versuch im flüssigen Medium durch und konnte nach 12 Passagierungen nur 1 - 5 % Plasmidverluste feststellen (Percival et al., 1976). Roberts et Elwell führten den gleichen Versuch auf Agarplatten durch und es zeigte sich, daß unter Selektionsdruck, auch nach 8wöchiger Subkultivierung, kein Plasmidverlust eintrat (Roberts et Elwell, 1977).

Worin liegt diese Stabilität nun begründet?

Seit im Jahre 1976 die ersten Penicillin-resistenten Gonokokkenstämme entdeckt wurden (Ashford and Golash, 1976 und Phillips, 1976), erhöhte sich im Laufe der Zeit ständig die Stabilität. Verantwortlich scheint dafür ein 24,5 M-Dalton Plasmid zu sein, das in immer höherem Ausmaße den β -Lactamase bildenden Gonokokkenstämmen beizuwohnen scheint. Roberts und Falkow fanden 1976 nur 5 %, Roberts und Elwell (1977) bereits fast 50 % und Dickgiesser konnte 1983 bei fast allen penicillinresistenten Stämmen solche 24,5 M-Dalton Plasmide nachweisen. Die getesteten Stämme, wie in 4.9 beschrieben, wurden alle erst 1983 an der Dermatologischen Universitätsklinik München isoliert und dürften damit mit großer Wahrscheinlichkeit auch Träger des 24,5 M-Dalton Plasmides sein.

Weitere Versuche zeigten, daß es zwei verschiedene Plasmidtypen gibt, die für die β -Lactamase-Bildung verantwortlich sind, einmal das 4,5 M-Dalton Plasmid, das als Typ aus dem Fernen Osten bezeichnet wird, wo auch unsere Versuchsstämme ihren Ursprung haben, und dann das 3,2 M-Dalton Plasmid, das sich in afrikanischen Stämmen findet (Dickgiesser, 1983). Mehrere Autoren stellten fest, daß das 4,5 M-Dalton Plasmid das wesentlich stabilere ist (van Embden et al, 1980; Dillon and Duck, 1981). Sicherlich spielen auch die günstigen Lebensbedingungen für die Gonokokken im flüssigen Medium (Hafiz and McEntegart, 1976) eine Rolle.

In verschiedenen Versuchen haben die Autoren für die von ihnen angegebene Bouillon gezeigt, daß darin die Gonokokken besser und schneller wachsen als auf festem Medium. Umspült von einem hervorragenden Nahrungsangebot, sehen sich die β -Lactamase-bildenden Gonokokkenstämme nicht gezwungen, ihr Plasmid abzuwerfen. Betrachtet man nun all diese Fakten im Zusammenhang, so muß man sagen, daß bei den getesteten Stämmen wahrscheinlich alle Voraussetzungen für eine hohe Stabilität gegeben waren, und es erscheint erklärlich, daß nur eine plasmidfreie Einzelkolonie isoliert werden konnte. Im oben erwähnten Versuch von Percival (1976), der im flüssigen Medium 1 - 5 % Plasmidverluste erfassen konnte, stand diese Rate bereits nach wenigen Passagierungen fest und veränderte sich im Laufe des Versuches auch nicht mehr. Da bei unserem Versuch bei der täglichen Kontrolle keine Einzelkolonien getestet wurden, sondern Gonokokkenmaterial von vielen Einzelkulturen gleichzeitig, hätte man auch nur Plasmidverluste erfassen können, wenn sie von fast allen Bakterien auf einmal abgeworfen worden wären. Eine Einzelkolonietestung erfolgte erst nach Abschluß der Versuche. So könnte es also durchaus sein, daß auch in unserem Versuch bereits nach wenigen Passagierungen, analog zu Percival, einige Plasmidverluste eintraten.

Nun aber zum zweiten Teil der Fragestellung, nämlich wie die Antibiotikumempfindlichkeit vom Plasmid beeinflußt wird.

Es muß vorausgeschickt werden, daß Unterschiede im Bereich einer Konzentrationsstufe als normal betrachtet werden müssen; sie entstehen durch versuchsbedingte Schwankungen, die nicht immer auszuschalten sind.

Die MHK-Werte auf festem Medium und in Bouillon (siehe Tabelle 1 - 4) ergaben keine Unterschiede. Da es sich auch beim Schokoladenagar um ein gutes Nährmedium handelt, war es keine Überraschung, daß es bei der Empfindlichkeit keine größeren Abweichungen im Testverfahren gab.

Betrachtet man die Ergebnisse der MHK-Bestimmungen der plasmidtragenden Gonokokken auf festem Medium, vor Versuchsbeginn und nach 30 Passagierungen, so stellt man auch hier fest, daß sich praktisch keine Veränderungen ergaben (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Vergleichende MHK-Werte von Penicillin und Cefotiam vor Versuchsbeginn und nachher

$\bar{g}$ -Werte von: Penicillin Cefotiam $\mu\text{g/ml}$		
vorher:	406	0,315
nachher:	362	0,253

Die 30 Subkultivierungen unter subinhibitorischen Antibiotikumkonzentrationen reichen also nicht aus, um wesentliche Änderungen in der Empfindlichkeit herbeizuführen.

Im Vergleich von den plasmidtragenden Gonokokken zu der Einzelkolonie, die ihr Plasmid verlor, zeigte sich (Tabelle 11), daß beim Penicillin G ein großer Konzentrationssprung eintrat und sich damit die Empfindlichkeit wieder stark erhöhte. Die Empfindlichkeit gegenüber Cefotiam blieb konstant, gegenüber Cephalotin und Cefazolin nahm sie etwas zu (Unglaub, persönliche Mitteilung, 1985).

Tabelle 11: MHK-Werte vom Auxo-Typ II mit und ohne Plasmid

$\bar{g}$ -Werte $\mu\text{g/ml}$ von:

	Penicillin	Cefotiam	Cephalotin	Cefazolin
mit Plasmid	406	0,315	16	8
ohne Plasmid	4	0,5	8	4

Diese Ergebnisse zeigen an, daß durch die Anwesenheit des Plasmids das Penicillin G zur Unwirksamkeit verurteilt wird. Nach Abgabe dieses Plasmides fallen die MHK-Werte von 512 $\mu\text{g/ml}$ bis auf 4 $\mu\text{g/ml}$ ab und die Gonokokken sprechen unter Umständen wieder auf eine Penicillin-Therapie an.

Aus der chemischen Strukturformel ersieht man, daß auch die Cephalosporine einen β -Lactamring enthalten. Damit unterliegen sie, ähnlich

dem Penicillin, ebenfalls der Hydrolyse durch die β -Lactamase, wenn-
gleich auch in wesentlich geringerem Umfang (Voß und Naber, 1982).

Die älteren Cephalosporine wie Cephalotin und Cefazolin scheinen gegen-
über der Hydrolyse noch etwas anfälliger zu sein als Cefotiam (Percival,
1976) aus der zweiten Generation. Antibiotika aus der dritten Genera-
tion wie z. B. Ceftizoxim (Korting, 1984) sind äußerst stabil, und un-
terliegen kaum mehr Abbauvorgängen, die die Wirksamkeit beeinflussen.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Seit im Jahre 1976 erstmals Penicillin-resistente Gonokokken auftraten, mußten ganz neue Behandlungswege eingeschlagen werden. Penicillin war nicht mehr das Mittel der Wahl.

Als neue Antibiotikumgruppe traten nun die Cephalosporine in die Therapie der Gonorrhoe ein. Vor ihrer breiten Einführung müssen noch grundlegende Untersuchungen durchgeführt werden. In unserem Versuch sollten in vitro die Häufigkeit des Plasmidverlustes bei wiederholter Passagierung unter subinhibitorischen Konzentrationen der Antibiotika Penicillin und Cefotiam bestimmt werden und darüber hinaus die Abhängigkeit der MHK-Werte von den Plasmiden.

Nach Ermittlung der MHK-Werte auf festem Medium und in Bouillon, es ergaben sich praktisch keine Abweichungen, und nach Bestimmung der Gonokokkenkeimzahl bei einer optischen Dichte von 0,15 bei 500 nm Wellenlänge, konnte mit dem Hauptversuch begonnen werden.

6 verschiedene plasmidtragende Gonokokkenstämme wurden in Bouillon eingerieben, bis zu einer optischen Dichte von 0,15. Nach Zugabe von je zwei verschiedenen subinhibitorischen Konzentrationen der Antibiotika Penicillin und Cefotiam, wurden alle Ansätze 24 Stunden bebrütet und anschließend dem Test mit chromogenen Cephalosporinen unterzogen. Die über Nacht auf Werte bis zu 0,7 optischer Dichte herangewachsenen Gonokokken wurden mit frischer Bouillon wieder auf 0,15 herunterverdünnt, erneut den oben genannten Antibiotika ausgesetzt und bebrütet. 30 solche Passagierungen wurden durchgeführt, wobei kein Plasmidverlust festgestellt werden konnte. Nach Abschluß dieser Versuche erfolgte eine erneute MHK-Bestimmung. Verglichen mit den Werten vor Versuchsbeginn zeigten sich keine Änderungen.

Aus dem Gonokokkenmaterial der letzten Passagierung wurden nun 2400 Einzelkolonien ausgestrichen und auf Plasmidverlust hin getestet. Eine Einzelkolonie konnte isoliert werden, die unter dem Einfluß der höhe-

ren Cefotiamkonzentration ihr Plasmid abgab. Die davon ermittelten MHK-Werte zeigten, daß der Stamm wieder penicillinempfindlich wurde und daß die Werte für Cefotiam verglichen mit denen vom Vorversuch keine Änderungen aufwiesen. Es wurde deutlich, daß β -Lactamase-bildende Gonokokken aus jüngerer Zeit eine wesentlich höhere Stabilität besitzen, als solche, die Mitte bis Ende der siebziger Jahre isoliert wurden. Obwohl Cefotiam, ein Cephalosporin aus der zweiten Generation, ein sehr wirksames Antibiotikum darstellt, wird es wohl nicht zum Mittel der Wahl bei der Gonorrhoe werden. Dafür scheinen Cephalosporine der dritten Generation, wie z. B. Ceftizoxim geeignet, die hochwirksam sind, auch in niedrigsten Konzentrationen und die praktisch auch keiner Hydrolyse mehr unterliegen.

8. VERZEICHNIS DER TABELLEN

- Tabelle 1: MHK-Werte für Penicillin auf festem Medium vor Beginn des Hauptversuchs
- Tabelle 2: MHK-Werte für Cefotiam auf festem Medium vor Beginn des Hauptversuchs
- Tabelle 3: MHK-Werte für Penicillin in flüssigem Medium vor Beginn des Hauptversuchs
- Tabelle 4: MHK-Werte für Cefotiam in flüssigem Medium vor Beginn des Hauptversuchs
- Tabelle 5: MHK-Werte für Penicillin auf festem Medium nach Abschluß des Hauptversuchs
- Tabelle 6: MHK-Werte für Cefotiam auf festem Medium nach Abschluß des Hauptversuchs
- Tabelle 7: MHK-Werte für Cephalotin
- Tabelle 8: MHK-Werte für Cefazolin
- Tabelle 9: MHK-Wert des plasmidfreien Stammes
- Tabelle 10: Vergleichende MHK-Werte von Penicillin und Cefotiam vor Versuchsbeginn und nachher
- Tabelle 11: MHK-Werte vom Auxo-Typ II mit und ohne Plasmid

9. LITERATURVERZEICHNIS

- Ashford, W.A., R.G. Golash, V.G. Hemming: Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. *Lancet* II: 657 - 658 (1976)
- Blog, F.B. et al.: Penicillinase-producing strains of *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Rotterdam. *Brit. J. Vener. Dis.* 53: 98 - 100 (1977)
- Brown, St., T. Warnnisson, J. Biddle, K. Panikabutra, A. Traisupa: Antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* in Bangkok: Is single-drug treatment passé? *Lancet* II: S. 1366 - 1368 (1982)
- o'Callaghan, C.H. et al.: Novel Method for Detection of β -Lactamase by Using a Chromogenic Cephalosporin Substrat. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 1: 282 - 288 (1972)
- Carifo, K., B.W. Catlin: *Neisseria gonorrhoeae* auxotyping: differentiation of clinical isolates based on growth responses on chemically defined media. *Appl. Microbiol.* 26: 223 - 230 (1973)
- Dickgießer, N.: β -Laktamase-positive *Neisseria gonorrhoeae*: Isoelektrofokussierung der β -Laktamasen und Plasmidnachweis im Agarosegel. *Akt. Dermatol.* 9: 179 - 183 (1983)
- Dillon, J.A.R., P. Duck, D.Y., Thomas: Molecular and phenotypic characterization of penicillinaseproducing *Neisseria gonorrhoeae* from Canadian sources. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 19: 952 - 957 (1981)
- Eichmann, A., J.-C. Piffaretti: Penicillinase producing *Neisseria gonorrhoeae* in Zürich, Switzerland. *Br. J. Vener. Dis.* 60; S. 147 - 150 (1984)
- Elwell, L.P., M. Roberts, S. Falkow: Plasmid-mediated β -lactamase production in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 11: 518 - 533 (1977)
- Van Embden, J.D.A., B., van Klingeren, M. Dessens-Kroon, L.J., Wijngaarden: Penicillin-producing *Neisseria gonorrhoeae* in the Netherlands. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 18: 789 - 797 (1980)
- Van Embden, J.D.A., B. van Klingeren, L.J. van Wijngaarden, M. Dessens-Kroon: Penicillinase-producing gonococci in the Netherlands. *J. Antimicrob. Chemother.* 11, S. 15 (1983)
- Hafiz, S., M.G. Mc Entegart: Prolonged survival of *Neisseria gonorrhoeae* in a new liquid medium. *Brit. J. vener. Dis.* 52: 381 - 383 (1976)
- Kirven, L.A., C. Thornsberry: Transfer of β -lactamase genes of *Neisseria gonorrhoeae* by conjugation. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 11: 1004 - 1006 (1977)
- Korting, G.W., Petzold: *Gonorrhoea, Dermatologie in Praxis und Klinik*, Thieme Verlag, New York: 44,3 - 44,13 (1981)

- Korting, H.C.: In vitro susceptibility of recent isolates of *Neisseria gonorrhoeae* to cephalosporins of different generations and penicillin G: A comparative evaluation. *Dermatologica* 168: 67 - 72 (1984)
- Korting, H.C., D. Abeck: The susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* strains to different cephalosporins and penicillin G depends on the auxo-typ. *Chemother. im Druck*
- Maness, M.J., P.F. Sparling: Multiple resistance due to a single mutation in *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect. Dis.* 128: 321 - 330 (1973)
- Osoba, A.O. et al.: Review of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* in Ibadan, Nigeria, and their susceptibility to antibiotics. *Eur. Sex. Transm. Dis.* 1: 145 - 148 (1984)
- Percival, A. et al.: Penicillinase-producing gonococci in Liverpool. *Lancet* II: 1379 - 1382 (1976)
- Phillips, I.: β -lactamase-producing, penicillin-resistant gonococcus. *Lancet* II: 656 - 657 (1976)
- Piot, P., E. van Dyck, et al.: In vitro activity of cefotaxim and other cephalosporins against *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 6: 47 - 50 (1980)
- Piot, P.: β -lactamase producing *Haemophili* and *Neisseria*. *Acta Clin. Belg.* 33: 45 - 54 (1978)
- Roberts, M., L.P. Elwell, S. Falkow: Molecular characterization of two β -lactamase-specifying plasmids isolated from *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bact.* 131: 557 - 563 (1977)
- Roberts, M., S. Falkow: Conjugal transfer of R plasmids in *Neisseria gonorrhoeae*. *Nature* 266: 630 - 631 (1977)
- Voß, H., K. Naber: Halospor, Cefotiam, ein parenterales Breitspektrum-Cephalosporin. *MMW Medizin Verlag München* (1982)

Herrn Prof. Dr. Otto Braun-Falco danke ich für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit, diese Arbeit an der Dermatolog. Universitätsklinik München durchzuführen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. H.C. Korting für die Anleitung bei der praktischen Arbeit und die unermüdliche Betreuung und für die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Ferner danke ich allen Mitarbeitern der bakteriologischen Abteilung.

LEBENS LAUF

- 1954 am 28. Dezember als erstes Kind des Beamten Karl Schmelzer und seiner Ehefrau Rosa-Maria in Tutzing geboren
- 1961 Einschulung in die Volksschule Tutzing
- 1965 Übertritt an das Neusprachliche Gymnasium Tutzing
- 1976 Abitur an dieser Schule;
anschließend bis Studiumsbeginn als Bürohilfskraft bei der Boehringer Mannheim GmbH, Werk Tutzing, beschäftigt
- 1980 Aufnahme des Studiums der Zahnheilkunde an der Ludwig-Maximilians-Universität München
- 1983 Zahnärztliche Vorprüfung
- 1984 Eheschließung mit der Realschullehrerin Roswitha Egold
- 1986 Staatsexamen

